

# 菌根性きのこのシロ形成技術の開発

藤原 直哉

## Development of technology for mychollyzal fungul colony formation

Naoya FUJIWARA

### 要 旨

藤原直哉：菌根性きのこのシロ形成技術の開発 岡山県林試研報23：21-26 2007 マツタケ等菌根性きのこの栽培を目的として、人工的にシロを形成させる試験を行った。マツタケの胞子やひだを採取し、アカマツ林に埋設したところ、複数の接種か所で菌根の形成が確認された。DNA鑑定の結果、1か所のみマツタケであることを確認したが、他では確認できなかった。同じ手法でアマタケの胞子接種試験を行ったが、感染は確認できなかった。ホンシメジの培養菌糸を根切り処理した抵抗性アカマツに接種して、3か月間温室内で育成したところ、ホンシメジの子実体が発生した。

キーワード：菌根性きのこ、マツタケ、シロ、胞子、アカマツ

### I はじめに

岡山県の特産林産物のうち、マツタケを代表とする菌根性きのこは古くから利用され、季節限定商品として定着している。全県的には主にアマタケ（地方名 ズイタケ、イクチ、以下括弧内は県内の地方名を記す。）、キシメジ、クロカワ（クロコ）、コウタケ、シモコシ（キシメジ）、シャカシメジ、ホンシメジ（ホテイシメジ）、マツタケ等が好んで採取されている。地域的には、アブラシメジ（オオドベ）、ウラベニホテイシメジ（イッポンシメジ、ニガシメジ）、カノシタ、サクラシメジ（アカタケ、タニワタリ、ヤキモンソウ）、ショウゲンジ（コムソウ、オオシバ、オオシバカツギ）、シロシメジ（オバサン）、ニセアブラシメジ（コシバ）、ヌメリイグチ（イクチまたはイグチ）、ヌメリササタケ、ハツタケ（アイタケ）、ハナイグチ、バカマツタケ、ホウキタケ（ネズミタケ、ネズミデ）、ムラサキアブラシメジモドキ、ムレオオフウセンタケ（サブロウ、サブロウダケ）等が、新見市、真庭市、久米南町、鏡野町、赤磐市とその周辺地域で利用され、ショウロも倉敷市の沿岸部で採取されている（藤原 私信）。最近では、石川県の能登半島や福井県周辺で好まれ、高価に取引されている「コノミタケ」も高梁地域で確認され、2005年には、高梁市備中町で黒トリュフが確認されている。

これらの菌根性きのこは、発生適期にあたる春期、秋期の天候が不順になり、年々減少しているため、益々珍重される傾向にある。特にマツタケは、中国、カナダ、韓国等諸外国からの輸入品も市販されているが、依然として国産品の優位性は揺らいでいない。

この中で岡山県産のマツタケは、全国の市場においても高品質と評価され、品薄時の良品は、市販価格 3万円/100g 前後で取引されている。そのため、県内生

産者の人工栽培に関する期待は非常に大きい。1960年代から現在に至るまで、全国各地で試行錯誤を重ねているが、確実な人工栽培方法は報告されていない。その理由として、人工培地では菌糸の成長が非常に遅く、子実体の形成に必要な菌糸の量が得られないことや、野外林地のアカマツへの感染が容易でないことが挙げられる。稀に感染しても、周辺の細根に拡大しなかったり、寄生性が強すぎて苗木の枯死を招くなど、シロに成長しない。近年では生産者の高齢化に伴い、落葉等の腐葉物が大量に堆積するなど、手入れ不足によってアカマツ林内の環境が大きく変化することも新たな問題となっている。

マツタケを発生させるためには、15～30年生の若いアカマツ林の造成と、その手入れは必須条件であるが、新しいシロが形成されなければ将来的に増産は見込めない。当场では、従来から環境整備や客土によって既存シロの活性化に取り組んできたが、今回の課題では、新たにシロを形成させる試験に重点を置いた。また、これまで形態観察により菌根やバクテリアを判別してきたが、より精度の高いDNA配列の違いによる判別方法を導入したので、その手法を付記する。この研究は、主に2004～2006年の単県課題「菌根性きのこのシロ形成技術の開発」で実施した。

### II 材料と方法

#### 1. 感染試験

##### マツタケ

マツタケの胞子による感染試験は、1999～2006年の期間、次の手順で行った（藤原ら 2003）。美咲町（旧旭町）試験地に発生した子実体を採取し、新鮮なうちに火炎殺菌を行ったメスやカミソリで担子器を含むひだを切

り取って回収した。このひだを鹿沼土（中粒）あるいは赤玉土（中粒）に混合した後に、3mm網目のネット（縦 30×横 20×厚さ 7cm）に充填した。この袋に水道水を適宜加えて乾燥を防ぎ、野外試験地に運搬した。林地では袋の大きさに合わせアカマツ林内の土壌を、長さ40～50cm、幅 30cm、深さ15cm程度掘り取った。その後周辺のアカマツ細根を切断し、袋を埋設して周辺の土壌と密着させた。接種場所は、場内試験地が2か所、美咲町（旧中央町）試験地、吉備中央町試験地（21世紀の森、<sup>すわたに</sup> 岨谷）の5か所である（表-1）。このうち、場内①、場内②、美咲町試験地の接種源を掘り取り、菌根の観察とDNA判定に供試し、残りの2か所は孢子接種試験のみとした。試験地の管理は、発生環境整備施業として、枯死木の除去、枝打ちを実施した。

表-1 試験地の概要と孢子接種数（2007年3月現在）

名称	場所	アカマツ林齢	接種数
場内①	勝央町植月中	24年	6個
場内②	〃 〃	10〃	11〃
美咲町	美咲町打穴上	39〃	20〃
21世紀の森	吉備中央町竹部	不明	5〃
岨谷	〃 岨谷	12年	8〃
合計	5か所		50個

#### ホンシメジ

2006年12月27日に、抵抗性アカマツ3年生苗木12本を苗畑（pH 7.0）から掘り取り、根切り処理を行った。その後、根の表面殺菌を行うために、苗木の根株を有効塩素濃度50～70ppmの殺菌水に24時間浸し、供試した。翌日、苗木を植物プランターのまさ土（pH 7.0）に植え付け、培養種菌（系統名：中央98）を根元に埋設し、温室内で翌年の3月末まで3か月間育成した。その後苗木を掘り起こして、肉眼観察により種菌の成育状況、感染状況、子実体の発生状況を調査した。

#### アマタケ

アマタケの子実体を新聞紙に伏せ、48時間静置して落下した孢子を回収した。この孢子を、スパーテルで掻き取って採集し、蒸留水に懸濁してから赤玉土に混合した後、2000年11月22日に美咲町（旧中央町）試験地に48個接種した（藤原ら 2003）。

#### 2. 菌根の観察

菌根は、透明化法（岡部 1997）で試料を作成し、トルイジンブルーO液で染色して、顕微鏡で観察した。

#### 3. DNA判定

DNAの判定は以下の手順に従い、1999～2005年まで

に行った孢子感染試験の菌根をそれぞれ接種した接種源から代表的な5本／個を選んで調査した。

##### ①DNAの抽出・精製

②PCR (Polymerase Chain Reaction, ポリメラーゼ連鎖反応) 増幅

##### ③濃縮

##### ④電気泳動・染色

##### ⑤精製

##### ⑥シーケンス反応（鋳型DNAの熱変性処理）

##### ⑦シーケンス・ラン（DNA配列読み取り）

##### ⑧読み取りデータ補正

##### ⑨相同性検索

##### ①DNAの抽出・精製

菌根の種判定は、マツタケ特有の遺伝子配列を増幅できるカスタムプライマー（マツタケ専用設計されたプライマー）を用いたDNA判定（Kikuchi *et al.* 2000）によって行った。一連の操作は培養菌糸からのDNA抽出に準じた（藤原 2005）。

##### ②PCR増幅

乾燥させたDNAをTE（トリス塩酸とEDTAの混合液、DNAの溶媒）に溶解させて、1倍、100倍、1000倍、10000倍と4段階に希釈した試料を複数作成し、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）増幅の鋳型とした。増幅は、サーマルサイクラー（TAKARA製 PJ2000, DNA増幅器）を用いた。カスタムプライマーによって、検出が確認できた試料は、さらに多様な生物の種判定が可能なユニバーサルプライマー（汎用プライマー）を用いて増幅した（White *et al.* 1994）。

##### ③濃縮

反応液をまとめて遠心分離器に3000回転で3秒間程度短時間運転した後、エタノール沈殿で濃縮し、回転真空乾燥機で乾燥後、20～30μlのTEに溶解させた。

##### ④電気泳動・染色

TAE（トリス酢酸塩とEDTAの混合液、電気泳動用溶液）と2.0%濃度の寒天ゲルに、色素液とTEを混合して電気泳動させ、精製した。その後チップ（TAKARA製 RECHOCHIP）と遠心分離器を用いて回収した。回収したDNA溶解液をエタノール沈殿と乾燥処理を行ってペレット状にした。これをサイクルシーケンスを行い、シーケンサー（ABI製 ABI3100, DNA配列を読み取る機器）でミトコンドリアDNAのリボソームRNAに相補するITS領域のDNA配列を読み取った。なお、サイクルシーケンスとシーケンスについては、ジーンネット（株）に委託した。DNA配列は、アメリカのNCBI（National Center for Biotechnology Information）と、日本のDDBJ（DNA Data Bank of Japan）を利用

し、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) に入力して、最も相同性の高い登録データを同一種として判断した。

#### 4. 土壌微生物のDNA判定

マツタケを含め、菌根性きのこのコロニーの成長は周辺環境の微生物相に大きく影響を受ける。落葉分解性のバクテリアが多い状態では、マツタケは成育できない。そこで、土壌中の微生物を明らかにし、マツタケの成育環境の指標とするため、バクテリアのDNA判定を行った。岡山県では、マツタケシロの活性化方法として、混合微生物を開発している(下川 1991)。今回は、この混合微生物を対象として、DNA鑑定を行った。材料とした混合微生物は、岡山県林試で継代培養した「33系」と「B82系」について実施した。これらの菌類は、放線菌とバクテリアの混合物で、微生物の集団として定義されており、個々の同定にはこれらの分離が必要になる。そのため、DNAの分離にDGGE (Denature Gradient Gel Electrophoresis, 濃度勾配ゲル電気泳動)法を用いて分離した。DGGE法についての詳細は、いくつかの文献が発刊されているが、今回は一法 (Sheffield *et al.* 1994) を参考にした。バクテリアDNAの抽出は、ボイル法により行い、PCR増幅までの操作については菌根のDNA抽出に準じた。PCR増幅には、バクテリアDNA検出用“Touch-Down”プログラムを使用した。プライマーは“BACT357FGC”および“BACT937R”を用いた。このプライマー(以下カスタムプライマー)は、後述のDGGE処理によって混合されたDNAを分離するため、バクテリアのDNAを特異的に増幅する配列に、GCクランプ(GとCの配列)を付加した設計となっている。DGGEには、BIO-RAD社の“D-Code”を使用した。この時、アクリルアミドゲルの濃度を段階的に、10-40%、10-70%、20-40%、40-70%と濃度範囲を変えて、バンドの分離条件が良い濃度を調べた。電気泳動は、100V、13時間の条件で行い、TAEバッファーは、温度を60°Cに設定した。その他の条件は説明書に準じた。アクリルアミドゲルは、電気泳動終了後、ガラス板ごとエチジウムブロミド染色液に30~60分間浸漬して紫外線撮影装置(UVP製 Chromato View C-75)で撮影した。

電気泳動したDNAのバンドを火炎滅菌済みのメスで切り取った後、適量のTEを添加して気温37°Cの恒温機で15時間静置し、DNAをTEに溶出させた。DNAの損失を最小限に抑えるため、さらにTEを加えて300  $\mu$ lに調整後、エタノール沈殿処理を行った。この段階で凝集・乾固された少量のDNAは、通常肉眼では観察できないが、顕微鏡等では無色のペレットとして確認できることがある。このペレットに10  $\mu$ lのTEを加えてよく溶解させてPCR増幅の鋳型に使用した。この場合バクテリア

用の増幅プログラムと、GCクランプの無いバクテリア用のカスタムプライマー“BACT357F”(Forward)および“BACT937R”(Reverse)を使用した。

### III 結果と考察

#### 1. 感染試験

##### マツタケ

接種源を掘り出したが、埋設した37個の接種源のうち美咲町の2個が不明となったため、延べ35個について菌根の侵入状況や、菌根の形成状況を調査した。接種源は土のうの形状をしているため、網を切り裂いて内側に侵入している植物の根を回収したところ、全てのネットに周辺に成育するアカマツだけでなく、ササ類、ツツジ類等の根が侵入し、アカマツ等の根に黒褐色、茶褐色、灰褐色、白色の菌根が多数形成されていた。アカマツの菌根では、黒褐色と、茶褐色の菌根がよく観察された。形態は、マツタケ菌がアカマツに感染した場合に形成される二股状の菌根(写真-1)のほか、フォーク状、こんぺいとう状、棒状の3種類を確認した。これらの菌根は、マツタケの菌根に酷似しているが、外観からマツタケの菌根と特定することは非常に困難であったため、客観的な判断についてはDNA判定の結果を指標とすることにした。

なお、いずれの接種源にもシロへの成長を期待させる兆候は観察されず、菌根の量の増大については課題を残した。

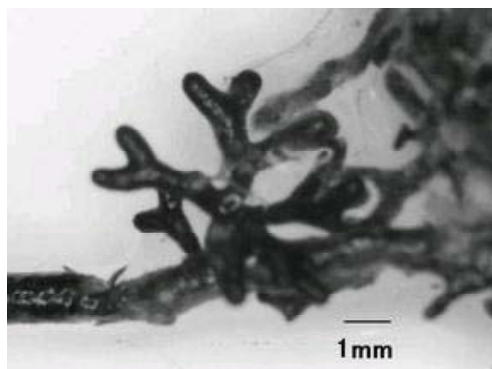


写真-1 代表的な菌根の形態(アカマツ)

##### ホンシメジ

アカマツの苗木の細根とホンシメジの種菌が接触した部分は、ホンシメジの菌糸が細根の表面に付着しており、全ての苗木で感染が確認できた(写真-2)。根系には新根が発達し、一つのプランターでは、底敷きに沿うアカマツの根から子実体が発生していた。また、埋設した種菌と感染した菌根からもそれぞれ子実体が発生した(写真-3)。



写真-2 根系の感染状況

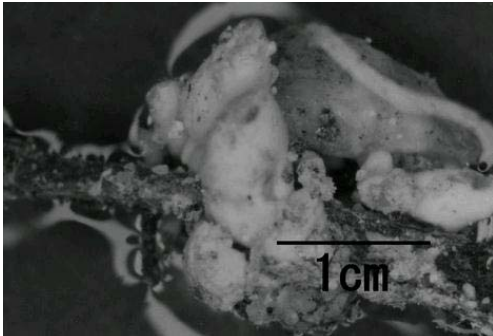


写真-3 菌根に発生したホンシメジの子実体

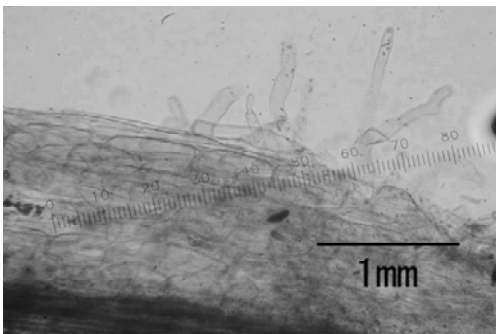


写真-4 アカマツ細根に付着したホンシメジの菌糸

使用した系統の「中央98」は、びん栽培で子実体は発生しないが、プランター栽培では栽培可能なことが確認された。この栽培法は種々のきのこの栽培に導入されており、ホンシメジについても、手軽な栽培方法として研究する余地が残されている。

#### アマタケ

開封した接種源を調べたところ、樹木の根が侵入している量が非常に少なく、掘り上げたほとんどの接種源で、菌根の形成が確認できなかった。また、アカマツの菌根の形成量は少なく、既報（竹内 1998）で、フォーク状とされる形態の菌根も確認できなかった。形成された菌根は、それぞれ一部を熱湯に浸して変色を観察したが、赤紫色の変色は確認できず、アマタケは感染していないと判断した。

#### 2. 菌根の観察

ホンシメジの子実体が発生したアカマツの菌根について、透明化法で観察した（写真-4）。

顕微鏡観察では、ホンシメジの菌糸が細根の表面に、横方向に付着していたが、内部への侵入は明確に判別できなかった。通常マツタケ等外生菌根菌は、リグニンやセルロースの分解能力が無いことから、寄主細根の周囲を菌糸が囲んでいるだけであり、内部への侵入は稀である。ホンシメジについても表層への接触または、根系内部への侵入の程度は小さいと思われる。

#### 3. DNA判定

##### マツタケ

今回のDNA判定で、1999年に場内①に埋設した胞子を含む接種源6個のうち、2個の接種源内部に形成された菌根はカスタムプライマーでマツタケと判定できた（写真-5のレーン5）。このうち1個の菌根のDNAを鋳型として ITS領域の配列を決定し、相同性検索したところ、DDBJとNCBIのデータベースにおいて、100%の確率でマツタケと一致した（表-2, 3）。残りの菌根1本は配列の読み取りに失敗し、種の特定に至らなかった。

しかし、35個の接種源から回収した大多数の他の菌根には、複数の生物に由来する汚染が検出されたり、電気泳動方法では分離ができない試料も多数あり、その他の試料は、カスタムプライマーを使用したPCR増幅ではマツタケと一致しなかった。結果として、接種源35個のうち2個しかマツタケのDNAと一致せず、今回の結果だけでは胞子接種による感染試験の有効性を認めることはできなかった。

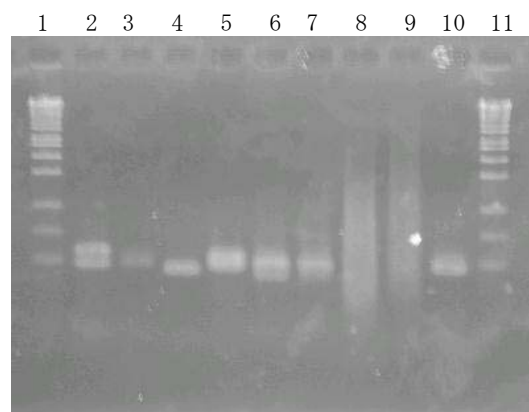


写真-5 菌根由来DNAのPCR増幅結果

（レーン1：マーカーλ-Hind III digest, レーン2：菌根No. 1, レーン3：菌根No. 2, レーン4：菌根No. 3, レーン5：菌根No. 4, レーン6：菌根No. 5, レーン7：菌根No. 6, レーン8：ホンシメジLS98, レーン9：水, レーン10：マツタケTm標準菌株菌糸由来DNA, レーン11：マーカー）

表-2 胞子接種した菌根のDNA配列 (Forward)

1	CTGGCTCTCC	GGGGCATGTG	CACGCTGAC	GCCAATCTTT
41	TCACCACCTG	TGCACATTTT	GTAGGCTTGG	ATAAATATGT
81	CTCGAGGAAG	CTCGGTTTGA	GGACTGCCGT	GCTGCAAAAG
121	CCAGGCTTTC	CTTGATTTTT	TCCAGCCTAT	GCATTTTATT
161	ATACACTCGG	TATGTCATGG	AATGTTATTT	GGTTGGCTTA
201	ATTGCCAGTA	AACCTTATAC	AACTTTCAAC	AACGGATCTC
241	TTGGCTCTCG	CATCGATGAA	GAACGCAGCG	AAATGCGATA
281	AGTAATGTGA	ATTGCAGAAT	TCAGTGAATC	ATCGAATCTT
321	TGAACGCACC	TTGGCTCTCT	TGGTATTCCG	AGGAGCATGC
361	CTGTTTGAGT	GTCATGAAAT		

表-3 胞子接種した菌根のDNA配列 (Reverse)

1	CCTATTACAT	TGTTACAAT	GGCGTAGATA	ATTATCACAC
41	CAAATGCTAG	ACAACAAGGG	CCCCGCTAAT	ACATTTAAGG
81	AGAGCAGACT	TCTGAGCAGC	CTGCAACAAC	TCCCAAAATC
121	CAAGCCTATT	CAACAAAAG	CTGAAAAGGT	TGAGAATTTT
161	ATGACTCTCA	AACAGGCATG	CTCCTCGGAA	TACCAAGGAG
201	CGCAAGGTGC	GTTCAAAGAT	TCGATGATTC	ACTGAATTCT
241	GCAATTCACA	TTACTTATCG	CATTTGCTG	CGTTCTTCAT
281	CGATGCGAGA	GCCAAGAGAT	CGTTGTTGA	AAGTTGTATA
321	AGGTTTACTG	GCAATTAAGC	CAACCAAATA	ACATTCATG
361	ACATACCGAG	TGTATAATAA	AATGCATAGG	CTGAAAAAAT
401	ACAAGGAAAG	CCTGGCTTTT	GCAGCACGGC	AG

ホンシメジ

判明した配列が560bpのDNA配列(表-4)をDDBJで検索したところ, "Lyophyllum shimeji" (ホンシメジ)と98%の確率で一致した。その他に "Lyophyllum decastes" (ハタケシメジ)と96%の確率で一致し, 読み取った配列の比較で, 両者の遺伝子配列の違いは小さく, 比較的近縁種であることが示唆された。

表-4 アカマツ苗木菌根のDNA配列

1	GATTTGAGGT	CAAAGGNCAG	AAGTTGTCCC	TAGAGGGACA
41	ATTAGAAGCA	GAACCTCTCA	ACAGAGTTGA	GGCTGACACT
81	CCCATGGCGT	AGATAATTAT	CACACCAAGA	GATGATCAAC
121	AAAGGTTTCA	CTAATGCATT	TAAGGAGAGC	CGACTTCTGA
161	GAAGCCCGCA	ACCCCCACAT	CCAAGCCTGA	CCAAGCTCGC
201	AAAAGCTGGA	AAGGTTGAGA	ATTTAATGAC	ACTCAAACAG
241	ACATGCTCCC	CGGAATACCA	GGGAGCGCCA	GGTGCGTTCA
281	AAGATTTCAT	GATTCACTGA	ATTCTGCAAT	TCACATTAAT
321	TATCGCATTT	CGCTGCGTTC	TTCATCGATG	CGAGAGCCAA
361	GAGATCCGTT	GCTGAAAGTT	GTATTTGATT	AAAGGCACAA
401	AGGCCAGTAA	ACGACATTCT	GTTACATTCT	TATGGGGTAT
441	ATAAAAACAT	AGACCCAGAA	ATGCAAGGAA	AGCTGGCTTT
481	CACACANCAG	TCCTCAAACC	GAGTTTCTC	NAGAGATATC
521	CAGGTCTACA	AAAGGTGCAC	AGGTGGTNA	AATGGCGCTA

今回は, 100%完全に一致したシーケンスデータは得られなかったが, 500bp以上のDNA配列が判明し, 種判定には十分なデータが得られているため, 98%以上の塩基配列が一致したホンシメジのデータを, 該当の種と判定した。温室を利用したこれらの手法が, 野外での感染試験に応用可能であることが判明した。

4. 土壌微生物のDNA判定

DGGEの電気泳動では, ゲル濃度が最も薄い始点付近に多数の高分子のバンドと, 中央部に明瞭な2本のバンドが得られた(写真-6)。始点付近の複数のバンドは高分子の一本鎖DNAと思われ, 電気泳動を継続しても, 始点から1cm程度以上移動せず, バンド同士が近接しているため, 切り出しは困難であった。そのため, 切り出しが可能な2本のバンドのみをシーケンスの対象にした。2本のバンドはほぼ同じ位置にあり, DNA配列の差が小さいことを示している。シーケンスの結果, 両者の配列は一致しており, 生物種としては同一であることが判明した(表-5)。

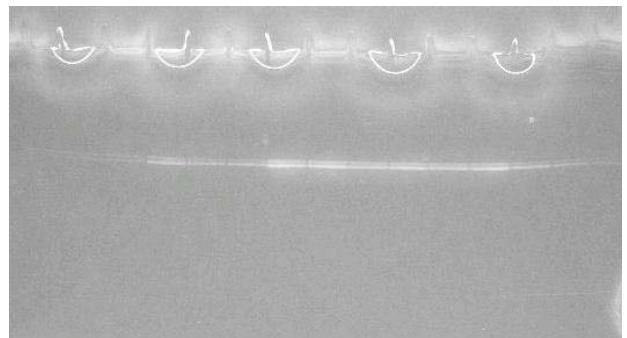


写真-6 DGGEによるDNAの分離

表-5 検出したバクテリアのDNA配列

1	TCTGANGGAG	CACGCCGCGT	GAGTGATGAA	GGCTTTCGGC
41	TCGTAAAAC	CTGTTGTTAG	GGAGAACA	GTGCTAGTTG
81	AATAAGCTGG	CACCTTGAGC	GTACCTAAC	AGAAAGCCAC
121	GGCTAACTAC	GTGCCAGCAG	CCGCGGTAAT	ACGTAGGTGG
161	CAAGCGTTAT	CCGGAATTAT	TGGGCGTAAA	GCGCGCGCAG
201	GTGGTTTCTT	AAGTCTGATG	TGAAAGCCCA	CGGCTCAACC
241	GTGGAGGGTC	ATTGGAAACT	GGGAGACTTG	AGTGCGAAG
281	AGGAAAGTGG	AATTCCATGT	GTAGCGGTGA	AATGCGTAGA
321	GATATGGAGG	AACACCAGTG	GCGAAGGCGA	CTTTCTGGTC
361	TGTAACAGTAC	ACTGAGGCGC	GAAAGCGTGG	GGAGCAAACA
401	GGATTAGATA	CCCTGGTAGT	CCACGCCGTA	AACGATGAGT
441	GCTAAGTGTT	AGAGGGTTTC	CGCCCTTTAG	TGCTGAAGTT
481	AACNNATTAA	GCACTCCGCC	TGGGGAGTAC	GGCCGCAAGG
521	CTGAAACTCA	NAGG		



読み取れなかったエラー部分（表示はN）を除いてデータベースに照合したところ、この配列と100%一致する生物として、*Bacillus*属を代表とする100件以上のバクテリアの登録データが照合された（表-6）。このデータは全ての塩基が完全に一致しており、現段階では差が無い。また高分子のDNAのバンドを、徒手で切り分けられる状態まで分離できなかったため、種の特定には至らなかった。

これらの*Bacillus*属は、水中や土壌中に棲息するバクテリアとして知られている。混合微生物は、放線菌とバクテリアの混合物で、カビ等マツタケの害菌に対して抗菌性を示す（下川 1991）。これまでマツタケのシロに散布を行ったが、特筆する効果が確認されていない。理由として、バクテリアは酸性条件下で増殖が抑制されることが挙げられる。マツタケは有機物が少ない弱酸性土壌を好み、乾燥条件下に棲息するため、人為的にバクテリアをマツタケのシロに散布しても、長期間シロに定着させることがやや困難と考えられる。下川（1989）は、土壌微生物とアカマツ林内のF層の厚さを調査し、F層が、2~3 cmの条件がシロ形成の適地条件として解析している。むしろ落葉層の調整や客土等適度な環境整備を実施することにより、マツタケシロの育成に適した条件に誘導することが最適な方法と考えられる。

表-6 照合した代表的なバクテリア

<i>Bacillus cereus</i>
<i>Bacillus mycoides</i>
<i>Bacillus samanii</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>
<i>Bacillus</i> sp.

#### IV おわりに

マツタケのシロ形成の発端となる菌根の形成を目的として、胞子の接種を試みた。接種後一定期間経過後に接種源を掘り出し、内側に形成されていた菌根を取り出した。これらを選別して、感染している生物のDNAを抽出し、DNA鑑定したところ、ほぼ全ての試験区では、マツタケを検出できなかったが、1か所のみマツタケのDNAを検出した。しかし、他の試験区では全く感染が確認できなかったことから、元々土壌中に存在していたマツタケである可能性が高い。また現段階ではシロへの成長が期待できないことから、今回の検出結果だけでは検証できないので、今後も再現性の確認が必要である。

菌根の顕微鏡観察では、マツタケ、ホンシメジいずれの場合でも菌根表面への付着は確認できるものの、内部への侵入は確認できなかったため、今後の課題としたい。

菌根のDNA鑑定については、長さ5mm程度の菌根であれば、ほぼ確実にDNAの抽出が可能になった。その後処理となるPCR増幅についても、マツタケの検出を目的としたカスタムプライマーと、シーケンス用のユニバーサルプライマーの両方で増幅が可能になった。これらの技術については、リボソームRNAのITS領域の増幅対象をIGS領域に変更することで、これまでの種判別だけでなく系統識別にも応用可能である。

土壌微生物の特定についても、DGGE技術を利用したDNA分離が可能になり、通常数か月と長期間を要する培養期間が不要になった。また、この手法では培養できない微生物の検出も可能である。そのため、土壌や植物の病原菌など、迅速な同定が可能になった。

今後は、これらの技術を応用し、マツタケ等菌根性きのこの土壌微生物を明らかにし、野外栽培に適した環境の誘導方法や、感染の判定を迅速に行い、マツタケの栽培技術の開発に活用したい。

最後に、微生物のゲノム解析についてご指導頂いた県立広島大学の森永教授に謝辞を申し上げる。

#### 引用文献

- 藤原直哉・竹内隆人（2003）菌根性きのこの安定生産技術の開発．岡林試研報 19:37.
- 藤原直哉（2005）マツタケ保存菌株の特性調査—培地特性とDNA判定—．岡林試研報 21:88.
- Kikuchi, K., Matsushita, N., Guerinlaguette, A., Ohta, A. and Suzuki, K.(2000) Detection of *Tricholoma matsutake* by specific ITS primers. *Mycol. Res.*104(12):1427-1430.
- 岡部宏秋（1997）菌根染色法・森づくりと菌根菌，pp80- 82. 林業科学技術振興所，東京.
- 下川利之（1989）マツタケ増殖技術開発に関する研究（IV）．岡林試研報 8:17-27.
- 下川利之（1991）菌根性きのこの林地栽培技術の開発（V）．岡林試研報 13:28-29.
- 竹内嘉江（1998）アマタケの人工的菌根形成試験について．中部森林研究 46:57.
- T. J. White, T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor（1994）系統発生研究のための真菌リボソームRNA遺伝子の増幅と直接シーケンス．PCR実験マニュアル, pp. 275-281. HBJ出版局，東京.
- Val C. Sheffield, David R. Cox, and Richard M. Myers（1994）変性勾配ゲル電気泳動によるDNAの多形型の同定. PCR実験マニュアル, pp179-189. HBJ出版局，東京.